

明 細 書

サルORL1遺伝子及び化合物の評価方法

技術分野

- [0001] 本発明は、新規のサルORL1 (opioid receptor-like 1) 遺伝子、ORL1タンパク質、前記遺伝子を含む組換えベクター、前記組換えベクターを含む形質転換細胞、及び前記遺伝子又はタンパク質を用いた化合物の評価方法に関する。

背景技術

- [0002] ノシセプチン(オルファニンFQと同一物質)は、オピオイドペプチドと類似の構造を持つ17アミノ酸よりなるペプチドである。ノシセプチンは、侵害刺激に対する反応性の増強活性、食欲増進活性、空間学習能力を低下させる活性、古典的オピエイト作動薬の鎮痛作用に対する拮抗作用、ドーパミン放出抑制作用、水利尿作用、血管拡張作用、全身血圧降下作用などを有しており、脳内でノシセプチン受容体であるORL1を介して痛みや食欲の調節又は記憶・学習等に関与していると考えられている(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5及び非特許文献6)。
- [0003] また、ORL1の発現が阻止されたノックアウト・マウスにおいては、モルヒネ耐性が減弱されること又は記憶・学習能力が向上することが知られている(非特許文献7及び非特許文献8)。
- [0004] したがって、ORL1へのノシセプチンの結合を特異的に阻害する物質は、癌性疼痛、術後疼痛、偏頭痛、痛風、慢性リウマチ、慢性疼痛、神経痛等の痛みを伴う疾患に対する鎮痛薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬への耐性克服薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬への依存性克服薬、鎮痛作用増強薬、抗肥満薬、脳機能改善薬、アルツハイマー病治療薬、抗痴呆薬、精神分裂症治療薬、パーキンソン病及び舞踏病に代表される退行性神経変性疾患の治療薬、抗うつ薬、尿崩症治療薬、多尿症治療薬又は低血圧治療薬として有用であることが期待できる。
- [0005] ところで、ヒトORL1は、オピオイド受容体のクローニングの過程でオピオイド受容体遺伝子と高い相同性を有するオーファン受容体としてクローニングされた(非特許文

献9)。この受容体は、従来のオピオイドリガンドとの結合は認められず、その機能が不明であったが、その後、ORL1のcDNAが発現した細胞に脳ペプチド画分を反応させることにより、ノシセプチン又はオルファニンFQがcAMPを減少させる活性を有する内因性リガンドとして同定、単離された(非特許文献10及び非特許文献11)。

[0006] 一方、治療薬や診断薬の開発において、候補化合物は、げっ歯類及び霊長類においてその生理学的作用が評価される。これは、候補化合物が動物種によって異なる薬効を示すことがあるためであり、よりヒトに近い霊長類において評価することが効率的な治療薬や診断薬の開発に結びつく。

非特許文献1:ネイチャー(Nature)、1995年、377巻、532頁

非特許文献2:ソサイエティー・フォー・ニューロサイエンス(Society for Neuroscience)、1996年、22巻、455頁

非特許文献3:ニューロレポート(NeuroReport)、1997年、8巻、423頁

非特許文献4:ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス(Eur. J. Neuroscience)、1997年、9巻、194頁

非特許文献5:ニューロサイエンス(Neuroscience)、1996年、75巻、1頁及び333頁

非特許文献6:ライフ・サイエンス(Life Sciences)、1997年、60巻、PL15頁及びPL141頁

非特許文献7:ニューロサイエンス・レターズ(Neuroscience Letters)、1997年、237巻、136頁

非特許文献8:ネイチャー(Nature)、1998年、394巻、577頁

非特許文献9:フェブス・レターズ(FEBS Letters)、1994年、341巻、33頁

非特許文献10:ネイチャー(Nature)、1995年、377巻、532頁

非特許文献11:サイエンス(Science)、1995年、270巻、792頁

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、ヒト以外の霊長類のORL1遺伝子は未だ単離されておらず、ヒト以外の霊長類の遺伝子を用いた治療薬や診断薬の評価は不可能な状況であった。

[0008] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、ヒト以外の霊長類のORL1遺伝子及びORL1タンパク質を提供することを目的とする。また、当該遺伝子又はタンパク質を用いた化合物の評価方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、アカゲザルORL1遺伝子を単離することに成功するとともに、当該受容体(アカゲザルORL1)を用いた結合実験によりリガンドの評価を行うことに成功し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明の核酸は、配列番号1に記載の塩基配列を含むことを特徴とする。

[0011] また、本発明の核酸は、配列番号1に記載の塩基配列からなることを特徴とする。さらに、本発明の核酸は、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードすることを特徴とする。このような核酸からなるサルORL1遺伝子(ORL1としての活性を有するタンパク質をコードする、サル由来の遺伝子)も本発明によって提供される。

[0012] また、本発明の核酸は、配列番号1に記載の塩基配列又はこれと相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつORL1タンパク質(ORL1としての活性を有するタンパク質)をコードする、サル由来の単離された核酸であることを特徴とする。このような核酸からなるサルORL1遺伝子も本発明によって提供される。

[0013] さらに、本発明の組換えベクターは、前述の核酸又は遺伝子を含有することを特徴とする。また、本発明の形質転換細胞は、前記組換えベクターを含むことを特徴とする。

[0014] また、本発明のタンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。さらに、本発明のタンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする。さらに、本発明のタンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列において1又は2以上のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、かつORL1としての活性を有する単離されたタンパク質であることを特徴とする。

[0015] このような核酸、遺伝子、タンパク質、発現ベクター又は宿主細胞を利用することに

より、霊長類ORL1又はその変異体の発現系の構築が可能となるとともに、当該発現系を用いた化合物の評価系の構築が可能となる。

[0016] また、本発明の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、当該遺伝子を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該遺伝子の発現によって得られるタンパク質（ORL1としての活性を有するサル由来のタンパク質）に対する当該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

[0017] さらに、本発明の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、当該遺伝子を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該細胞と被検化合物との接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の当該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。

[0018] さらに、本発明の化合物の評価方法は、被検化合物を、サルORL1タンパク質（ORL1としての活性を有するサル由来のタンパク質）に接触させる工程と、当該ORL1タンパク質と被検化合物との接触による前記ORL1タンパク質の活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

[0019] このような化合物の評価方法によれば、霊長類ORL1を使用した治療薬・診断薬の候補化合物の評価やスクリーニングが可能となり、よりヒトに近いモデルシステムによって効率的な薬剤の開発が可能となる。

発明の効果

[0020] 本発明の核酸、タンパク質及び化合物の評価方法によれば、ヒト以外の霊長類のORL1遺伝子及びORL1タンパク質を得ることが可能となるとともに、当該遺伝子又はタンパク質を用いて化合物の評価、スクリーニングを行うことが可能となる。従って、当該遺伝子又はタンパク質を用いた治療薬や診断薬の評価、開発が可能となる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は、アカゲザル(rhesus monkey)及びヒト(homo sapiens)のORL1タンパク質のアミノ酸配列の相同性を比較した図である。

[図2]図2は、アカゲザルORL1を用いた結合実験において、 $[^{125}\text{I}][\text{Tyr}^{14}]$ ノシセブ

チンの濃度とORL1への特異的結合量との関係を示すグラフである。

[図3]図3は、ヒトORL1を用いた結合実験において、 $[^{125}\text{I}][\text{Tyr}^{14}]$ ノシセプチンの濃度とORL1への特異的結合量との関係を示すグラフである。

[図4]図4は、アカゲザル又はヒトのORL1を用いた結合実験において、ノシセプチンの濃度と $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ のORL1への特異的結合量の関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0022] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

[0023] 本発明における「核酸」とは、例えば、DNA、RNA若しくは修飾されたDNA又はRNAをいい、好ましくはDNAをいう。また、前記DNAとしては、ゲノムDNAであるとcDNAであるとを問わず、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。

[0024] また、本発明における「単離された」核酸又はタンパク質とは、組換えDNA技術により作成された場合は細胞物質、培養培地を実質的に含有せず、化学合成された場合には前駆体物質又はその他の物質を実質的に含まない、核酸又はタンパク質をいう。

[0025] また、本発明における「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」とは、二つの核酸断片が、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールドスプリングハーバー(1989)、9. 47-9. 62及び11. 45-11. 61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。より具体的には、例えば、約45℃にて6. 0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃にて2. 0×SSCで洗浄する条件が挙げられる。ストリンジェンシー選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2. 0×SSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0. 2×SSC、50℃まで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで増大させることができる。

[0026] 次に、本発明に係るアカゲザルORL1について説明する。

[0027] 本発明に係るアカゲザルORL1遺伝子は、1113塩基のオープンリーディングフレーム(配列番号1)を有し、370アミノ酸のタンパク質(配列番号2)をコードする。

[0028] アカゲザルORL1遺伝子のクローニング方法としては特に制限はないが、具体的

には、例えば、アカゲザルORL1遺伝子又は当該遺伝子に相同性の高い遺伝子由来の核酸断片をもとに5' -RACE又は3' -RACEで全長cDNAを増幅する方法、適切なベクター(プラスミドベクター、バクテリオファージ等)を用いて構築されたcDNAライブラリーをアカゲザルORL1遺伝子の核酸断片を用いてスクリーニングする方法が挙げられる。

[0029] また、アカゲザルORL1遺伝子とヒトORL1遺伝子との間の相同性は、コーディング領域において約95.9%であり、44塩基が相違する。本発明の核酸には、配列番号1に記載の塩基配列において1又は2以上の塩基の置換、欠失、挿入又は付加があるものも含まれる。かかる置換、欠失、挿入又は付加された塩基の数としては、1~43塩基であることが好ましく、1~30塩基であることがより好ましく、1~20塩基であることがさらに好ましく、1~10塩基であることが特に好ましく、1~5塩基であることがさらに好ましい。また、このような核酸は、その相同性に基つけば、配列番号1に記載の塩基配列との相同性が96%以上であることが好ましく、97%以上であることがより好ましく、98%以上であることがさらに好ましく、99%以上であることが特に好ましい。ここで、このような核酸は、配列番号1に記載の塩基配列又はこれと相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離することにより得ることができる。また、そのような核酸は、その由来となる動物種は特に限定されないが、具体的には、例えば、サル由来のORL1遺伝子(ORL1としての活性を有するタンパク質をコードする遺伝子)であることが好ましく、サル由来のORL1遺伝子としては、例えば、アカゲザル、カニクイザル、ニホンザル、リスザル、ミドリザル、アヌビスヒビ又はコモンマーモセットのORL1遺伝子が挙げられる。

[0030] 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質(アカゲザルORL1タンパク質)は、上述したように、370アミノ酸からなる。図1に示されるように、アカゲザルORL1タンパク質(配列番号2)とヒトORL1タンパク質(配列番号3)との間の相同性は97.8%であり、7アミノ酸が相違する。

[0031] アカゲザルORL1の調製方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、単離したアカゲザルORL1遺伝子を発現ベクターに挿入した後、この発現ベクター(組換えベクター)を動物細胞、昆虫細胞又は大腸菌等の宿主細胞に導入して前記

遺伝子を発現させ、その遺伝子産物であるタンパク質を精製する方法が挙げられる。

[0032] 本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその変異体を含む。前記変異体としては、配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1又は2以上6以下のアミノ酸が置換、欠失又は挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質や、1又は2以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。このような変異タンパク質は、生物学的に活性であることが好ましく、ORL1としての活性を有することがより好ましい。

[0033] また、本発明は以下のいずれかの核酸又は遺伝子を含有する発現ベクター（組換えベクター）をも提供する。

1. 配列番号1に記載の塩基配列を含む単離された核酸。
2. 配列番号1に記載の塩基配列からなる単離された核酸、又はこの核酸からなるサルORL1遺伝子。
3. 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする単離された核酸、又はこの核酸からなるサルORL1遺伝子。
4. 配列番号1に記載の塩基配列又はこれと相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつORL1としての活性を有するタンパク質をコードする、サル由来の単離された核酸、又はこの核酸からなるサルORL1遺伝子。

[0034] 本発明の組換えベクターは、公知の方法に従って、本発明の核酸又は遺伝子を適当な発現ベクターに挿入することにより得ることができる。ここで、前記発現ベクターとしては、当業者に周知のベクターであれば特に制限はなく、例えば、pcDNA3. 1、pBlueBacHis2、pCI-neo、pcDNAI、pMC1neo、pXT1、pSG5、pEF1/V5-HisB、pCR2. 1、pET11、 λ gt11又はpCR3. 1が挙げられる。本発明の組換えベクターは、宿主細胞中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列（SD配列）及びターミネーターを含んだものであることが好ましい。

[0035] また、前記1. における「配列番号1に記載の塩基配列を含む」とは、前記塩基配列に、ベクターとのリンカー配列や遺伝子組換えに使用可能な制限酵素切断部位等の遺伝子の改変に必要な配列が付加されていることをいう。

[0036] さらに、本発明は、前記組換えベクターを含む宿主細胞（形質転換細胞）をも提供する。

[0037] 本発明の形質転換細胞は、公知の方法に従って、本発明の組換えベクターを適当な宿主細胞中に導入することにより得ることができる。当該宿主細胞としては、当業者に周知の細胞であれば特に制限はなく、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれでもよい。かかる細胞としては、具体的には、例えば、COS1、COS7、CHO、NIH／3T3、293、Raji、CV11、C1271、MRC-5、CPAE、L-M(TK-）、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。前記組換えベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法であれば特に限定されないが、具体的には、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法又は遺伝子銃法が挙げられる。

[0038] また、本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその変異体に対する抗体を含む。当該抗体は、前記タンパク質又はその一部のペプチドを抗原として調製することができ、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれであってもよい。当該抗体はエпитープとなるアミノ酸配列によってサルORL1タンパク質のみならず、異種のORL1タンパク質にも反応する場合があるが、サルORL1タンパク質にのみ選択性を有する抗体を調製する場合には、サルORL1タンパク質において異種のORL1タンパク質との相同性の低い領域をペプチド抗原として使用してモノクローナル抗体を調製することにより、所望の特異性を有する抗体を調製することができる。

[0039] 次に、本発明にかかる、配列番号1に記載の塩基配列を有する核酸、及び配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の用途について列挙し、それぞれ説明する。

[0040] (1)化合物の評価

本発明の核酸又はタンパク質を用いて、ORL1に作用する化合物の評価をすることができる。ORL1に対する作用を検出する方法として、被検化合物の当該受容体に対する特異的結合を検出する方法、被検化合物の接触によって変化した遺伝子の発現量を検出する方法、及び、当該接触によって生じたORL1を介した細胞内情

報伝達の活性を検出する方法が挙げられる。以下、順に説明する。

- [0041] 先ず、被検化合物の当該受容体に対する特異的結合を検出することにより、被検化合物を評価する方法について説明する。
- [0042] 本発明の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、当該遺伝子を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該遺伝子の発現によって得られるタンパク質(サルORL1タンパク質)に対する当該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。
- [0043] また、本発明の第2の化合物の評価方法は、サルORL1遺伝子を導入し、当該遺伝子を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該細胞と被検化合物との接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。
- [0044] 被検化合物としては、特に制限はなく、例えば、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物が挙げられる。
- [0045] また、サルORL1遺伝子を発現する細胞は、当業者が公知の方法で調製すればよく、具体的な方法としては特に制限はないが、例えば以下の方法によることができる。すなわち、先ず、本発明の配列番号1に記載の塩基配列を有する核酸又はその一部からなる核酸を好適なプロモーター及び転写調節エレメントを含む発現ベクターにクローニングする。ここで、前記ベクターとしては、発現ベクターとして利用可能なものであれば特に限定されないが、例えば、pcDNA3. 1、pBlueBacHis2、pCI-neo、pcDNAI、pMC1neo、pXT1、pSG5、pEF1/V5-HisB、pCR2. 1、pET11、 λ gt11又はpCR3. 1が挙げられる。
- [0046] 次に、本発明の核酸が挿入された発現ベクター(組換えベクター)を宿主細胞に導入する。かかる宿主細胞としては、遺伝子の発現に通常使用されるものであれば特に限定されず、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれであってもよく、具体的には、例えば、COS1、COS7、CHO、NIH/3T3、293、Raji、CV11、C1271、MRC-5、CPAE、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。また、前記組換えベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法であれば特に限定されない

が、具体的には、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法又は遺伝子銃法が挙げられる。

[0047] 次に、このようにして調製したORL1遺伝子を発現する細胞(形質転換細胞)に被検化合物を接触させる。接触させる方法としては特に制限はなく、例えば、水溶液や緩衝液のような溶液中で接触させる方法が挙げられる。

[0048] 細胞表面に発現した受容体と被検化合物との結合は、例えば、結合した化合物に付された標識による検出(例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する)のほか、被検化合物の細胞表面上の前記受容体への結合による細胞内へのシグナル伝達(例えば、Gタンパク質の活性化、 Ca^{2+} 、又はcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化、受容体のインターナリゼーション)を指標に検出することができる。また、前記シグナル伝達によって生じたシグナル伝達経路上の分子の発現レベルや活性を指標にすることもできる。ここで、当該発現レベルを指標とする場合、発現レベルの測定法は特に制限されないが、例えば、ノーザンブロッティング、ウェスタンブロッティング又はDNAチップが挙げられる。ここで、本発明における「発現レベル」とは、ORL1を介した情報伝達経路上に存在するタンパク質をコードする遺伝子(DNA又はmRNA)の転写産物(mRNA)又は翻訳産物(タンパク質)の絶対量又は相対量をいう。また、シグナル伝達経路上の分子の活性を指標にする場合、活性測定方法は特に制限されず、測定の対象となる分子の種類によって好適な方法を選択すればよい。

[0049] 一方、単離されたサルORL1タンパク質(ORL1としての活性を有するサル由来のタンパク質)を化合物の評価に直接使用することもできる。すなわち、被検化合物をサルORL1タンパク質に接触させ、次に、接触によって生じた前記ORL1タンパク質の活性の変化を検出する方法である。

[0050] かかる接触の方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液(リン酸緩衝液等)等の溶液中で混合することにより接触させる方法や、ORL1タンパク質をメンブレン上に固定し、メンブレン上で被検化合物と接触させる方法が挙げられる。

[0051] 次に、接触によって生じた前記ORL1タンパク質の活性の変化を検出する。

[0052] タンパク質の活性変化の検出方法としては、使用するタンパク質の性質により適宜

設定すればよく、具体的には、例えば、ORL1に対するノシセプチンの結合活性を指標にする方法が挙げられる。

[0053] 前記のノシセプチンの結合活性を指標にする方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、ORL1タンパク質が固定されたメンブレンに対する被検化合物の親和性を測定することによって結合活性を測定する方法が挙げられる。ここで用いられる被検化合物は、検出が容易なように放射性同位体等で標識されていてもよい。また、前記結合活性の検出方法として、放射性同位体で標識したノシセプチンと競合してORL1へ結合する化合物を検出する方法も挙げられ、かかる方法を用いた場合には、被検化合物の標識は不要である。

[0054] 以上のように、本発明の化合物の評価方法により化合物を検出した結果、被検化合物の存在下におけるノシセプチンの結合活性が、被検化合物の非存在下におけるノシセプチンの結合活性(対照)より低い値を示した場合には、当該被検化合物は、ORL1とリガンド又はそのアナログとの結合を阻害すると判定される。このような化合物は、前記受容体(ORL1)に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物(アゴニスト)及び当該活性を有しない化合物(アンタゴニスト)などが含まれる。アゴニストは、ORL1に対するリガンド及びそのアナログと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、ORL1に対するリガンド及びそのアナログが有する生理活性を有しておらず、リガンド及びそのアナログのORL1への結合を阻害する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、ORL1を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

[0055] また、本発明の化合物の評価方法により、ORL1への被検化合物の結合後の細胞内シグナル伝達を促進又は阻害する物質のスクリーニングを行うことができる。すなわち、上述した方法によって複数の被検化合物を評価することにより、アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する化合物を選択することができる。かかる選択の結果、被検化合物非存在下においてノシセプチン及びそのアナログを作用させた場合の細胞内シグナル伝達の変化と比較して、その変化が抑制されれば、当該被検化合物は、ORL1への被検化合物の結合後の細胞内シグナル伝達を阻害する化合物であると判定される。逆に、被検化合物が細胞内シグナル伝達を増強させれば、当該化合

物は、ORL1への被検化合物の結合後の細胞内シグナル伝達を促進する化合物であると判定される。このようなスクリーニング方法によって選択された化合物は、ノシセプチン及びORL1が関与する各種疾患に対する医薬、例えば癌性疼痛、術後疼痛、偏頭痛、痛風、慢性リウマチ、慢性疼痛、神経痛等の痛みを伴う疾患に対する鎮痛薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬への耐性克服薬、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬への依存性克服薬、鎮痛作用増強薬、抗肥満薬、脳機能改善薬、アルツハイマー病治療薬、抗痴呆薬、精神分裂症治療薬、パーキンソン病及び舞蹈病に代表される退行性神経変性疾患治療薬、抗うつ薬、尿崩症治療薬、多尿症治療薬又は低血圧治療薬として有用であると考えられる。

[0056] また、上述した本発明の化合物の評価方法により、PET (positron emission tomography) に用いるリガンドの評価を行うことができる。PETは、水、酸素、ブドウ糖、アミノ酸といった生体内に存在する物質あるいは目的とする受容体に対するリガンドを放射性同位体で標識して体内に投与することにより、非侵襲的に生体機能を観察する方法であり、研究や臨床において利用されている。PETの特徴は、トレーサーとして用いるリガンドに依存した機能特異的なイメージングを可能にする点にあり、新たなトレーサーの開発は未知の生体機能の解明や疾患の診断に不可欠である。本発明の化合物の評価方法によれば、被検化合物としてPETリガンド候補物質を適用することにより、当該物質のインビトロでの評価を行うことが可能となる。

[0057] (2) ハイブリダイゼーションに用いるプローブ

本発明の配列番号1に記載の塩基配列の一部、又は全部からなる核酸をハイブリダイゼーション用のプローブとして使用することにより、ORL1遺伝子を検出することが可能である。かかる検出としては、生体由来の組織や細胞を被検体としたORL1遺伝子の検出のみならず、ORL1遺伝子又は当該遺伝子と相同性の高い遺伝子のクローニング等にも応用可能である。また、前記核酸をプローブとして使用し、種々の組織における遺伝子発現を調べることにより、遺伝子発現の分布を同定することも可能である。

[0058] 前記核酸をプローブとして使用する場合、ハイブリダイゼーションの方法としては特に制限はなく、例えば、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション

ン、コロニーハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、fluorescence in situ hybridization (FISH)、in situ hybridization (ISH)、DNAチップ法が挙げられる。

[0059] 前記核酸をハイブリダイゼーション用のプローブとして使用する場合、少なくとも連続する20塩基の長さの核酸が必要であり、好ましくは40塩基、さらに好ましくは60塩基、特に好ましくは80塩基以上のものが使用される。また、当該プローブは、必要に応じて検出可能なように標識して用いてもよい。具体的には、例えば、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{35}S 等の放射性同位体で標識されていてもよく、ビオチン、蛍光色素、酵素、金コロイド等で標識されていてもよい。

[0060] また、前記核酸をハイブリダイゼーション用のプローブとして使用する場合のハイブリダイゼーションの条件としては、プローブの長さやハイブリダイゼーションの対象となる遺伝子の種類に応じて当業者が適宜選択すればよいが、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールドスプリングハーバー(1989)、9.47-9.62及び11.45-11.61を参照して行うことができる。より具体的には、約45℃にて6.0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃にて2.0×SSCで洗浄する条件が挙げられる。ストリンジェンシー選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0×SSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2×SSC、50℃まで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで増大させることができる。

[0061] (3) PCRに使用するプライマー

ORL1遺伝子を検出する方法として、本発明の配列番号1に記載の塩基配列の一部をプライマーとして使用したPolymerase Chain Reaction (PCR) 法を挙げることができる。

[0062] このようなプライマーの長さは、その塩基配列や単離する遺伝子の塩基配列等によって適宜設定することができるが、一般に、連続した10～60塩基であることが好ましく、15～30塩基であることがより好ましい。

実施例

[0063] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0064] (実施例1:アカゲザルORL1cDNAの単離)

全RNAはISOGEN(日本ジーン社製)を用いてアカゲザル前頭前野皮質から調製した。オリゴdTプライマー及びAMVトランスクリプターゼ(ライフサイエンス社製)を用いて、全RNAから1stストランドcDNAを合成した。ヒトORL1の5'及び3'非翻訳領域に設定したプライマー(5'-TACCGTACAGAGTGGATTTGC(配列番号3)、3'-ACGGGTACACGGACAG(配列番号4))を用いて、アカゲザル前頭前野皮質cDNAから全長のORL1を増幅した。遺伝子の増幅にはTaKaRa ExTaq(宝酒造社製)を用い、94℃で45秒、50℃で72秒、72℃で90秒を30サイクル行った。このようにして増幅された1.2kbの核酸断片を単離し、Eukaryotic TA Cloning Kit(インビトロゲン社製)を用いて発現ベクターpCR3.1にサブクローニングした。アカゲザルORL1の種々の箇所に設定したプライマーを用いてシークエンサーにより両鎖の塩基配列を決定した。塩基配列の確認は複数のクローンの塩基配列をシークエンスすることにより行った。

[0065] (実施例2:アカゲザルORL1安定発現細胞の構築)

アカゲザルORL1全長を含む発現ベクター(組換えベクター)をTransfectam Reagent(プロメガ社製)を用いてCHO(Chinese Hamster Ovary)-K1細胞にトランスフェクトした。この細胞は10%牛胎児血清及び1mg/mLジェネティシン(ギブコ社製)を含むHam's F12培地を用い、37℃、5%CO₂存在下で培養した。ジェネティシン抵抗性を示した細胞をクローニングし、¹²⁵I[Tyr¹⁴]ノシセプチンを用いたバインディングアッセイによりORL1を発現しているクローン(CHO-rhORL1)を同定した。

[0066] (実施例3)

メンブレンの調製:

まず、CHO-rhORL1細胞を、154mM NaCl、10mM KCl、0.8mM CaCl₂及び20%スクロースを含む10mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid(MOPS)緩衝液(pH7.4)中でホモジナイズした。ホモジナイズした溶液を10,00

0gで遠心分離した後、上清を100,000gで遠心分離した。得られた沈殿物を5mM HEPES/Tris (pH7.4) 中でホモジナイズした。タンパク質濃度は、BCAプロテインアッセイキット(シグマ社製)により、BSAを対照として測定した。

[0067] ラジオリガンド結合実験:

メンブレンを、種々の濃度(10~320pM)の $[^{125}\text{I}][\text{Tyr}^{14}]$ ノシセプチン、50mM HEPES、10mM NaCl、1mM MgCl_2 、2.5mM CaCl_2 、0.1% 牛血清アルブミン(BSA)及び0.025% バシトラシンを含む総量200 μL の溶液と、pH7.4、37°Cの条件下で60分間インキュベートした。また、メンブレンを1 $\mu\text{mol/L}$ の非標識のノシセプチン存在下でインキュベートした後に残存する放射活性の総量を非特異的結合とみなし、測定値から非特異的結合値を引いた数値を特異的結合値とした。インキュベーションは、セルハーベスターを用いて、0.5% ポリエチレンイミン(poly ethyleneimine)中で予浸したGF/Cフィルターを急速に通過させることにより停止させた。その後、フィルターは4°Cの5mM HEPES/Tris、0.1% BSA (pH7.4) で3回洗浄した。フィルター上に残った放射活性はガンマカウンター(パッカード社製)により測定した。また、得られた結果はプリズムソフトウェアパッケージ(Graphpad 社製)により解析した。

[0068] (比較例1)

アカゲザルORL1遺伝子に代えてヒトORL1遺伝子を用いた以外は実施例3と同様にして解析を行った。

[0069] 実施例3及び比較例1の結果(図2及び図3)より、アカゲザルORL1に対する $[^{125}\text{I}][\text{Tyr}^{14}]$ ノシセプチンの解離定数(kd)は27プラスマイナス4pMであり、ノシセプチンがサルORL1に対してもヒトと同様に高い親和性を有することが明らかとなった。

[0070] (実施例4: $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S結合実験)

実施例3において調製したメンブレンを、20mM HEPES、100mM NaCl、10mM MgCl_2 、1mM EDTA及び5 μM GDP、pH7.4の溶液中の200pM $[^{35}\text{S}]$ GTP γ Sとインキュベートした。この溶液にはコムギ胚芽アグルチニン(wheat germ agglutinin)でコートされたSPAビーズを加えてあり、種々の濃度のノシセプチン存在下又は非存在下、25°Cで2.5時間インキュベートした。また、メンブレンを非標識

のGTP γ S (10 μ mol/L) 存在下でインキュベートした後に残存する放射活性の総量を非特異的結合とみなし、測定値から非特異的結合値を引いた数値を特異的結合値とした。メンブレンに結合した放射活性は、トップカウントマイクロプレートシンチレーションカウンター (TopCount microplate scintillation counter) (パッカー社製) により検出した。

[0071] (比較例2)

アカゲザルORL1遺伝子に代えてヒトORL1遺伝子を用いた以外は実施例4と同様にして解析を行った。

[0072] 実施例4及び比較例2の結果 (図4に示すノシセプチンの用量反応曲線) より、アカゲザルORL1のEC₅₀ は2.3プラスマイナス0.4nMであり、サルORL1がノシセプチンに対してヒトORL1と同様な機能を有していると判断できた。

産業上の利用可能性

[0073] 本発明の核酸、タンパク質及び化合物の評価方法によれば、ヒト以外の霊長類のORL1遺伝子及びORL1タンパク質を得ることが可能となるとともに、当該遺伝子又はタンパク質を用いて化合物の評価、スクリーニングを行うことが可能となる。従って、当該遺伝子又はタンパク質を用いた治療薬や診断薬の評価、開発が可能となる。従って、ヒトの医薬の研究、開発の効率化に大きく貢献をするものである。

請求の範囲

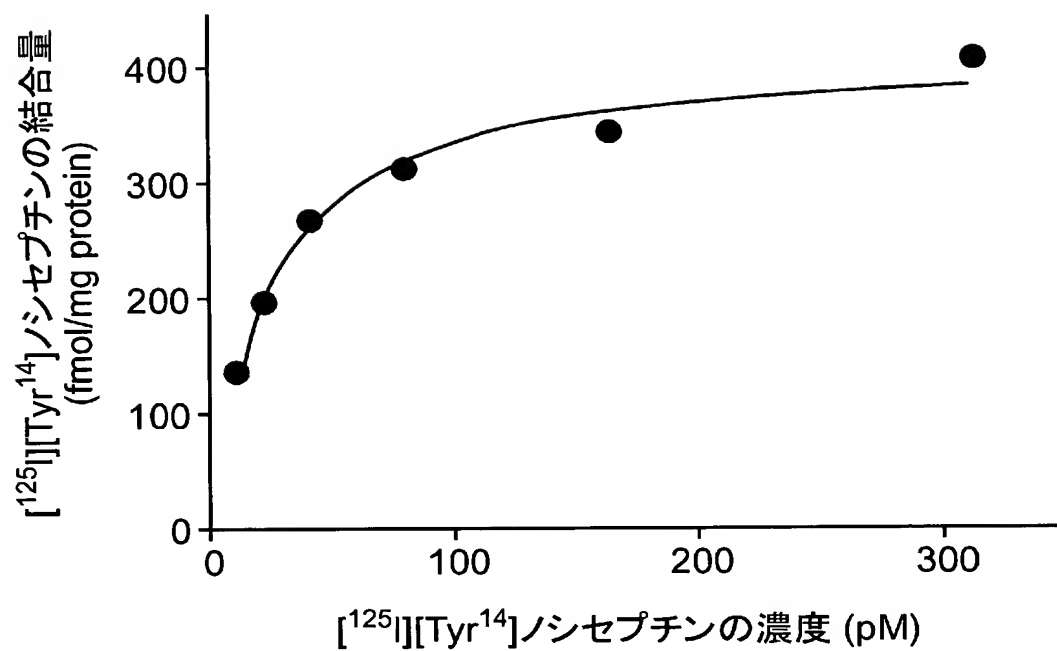
- [1] 配列番号1に記載の塩基配列からなる単離された核酸。
- [2] 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする単離された核酸。
- [3] 配列番号1に記載の塩基配列又はこれと相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつORL1としての活性を有するタンパク質をコードする、サル由来の単離された核酸。
- [4] 請求項1〜3のいずれか一項に記載の核酸からなるサルORL1遺伝子。
- [5] 請求項4に記載のサルORL1遺伝子を含有する組換えベクター。
- [6] 請求項5に記載の組換えベクターを含む形質転換細胞。
- [7] 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる単離されたタンパク質。
- [8] 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1又は2以上のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、かつORL1としての活性を有する単離されたタンパク質。
- [9] サルORL1遺伝子を導入し、該遺伝子を発現する細胞を調製する工程と、
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、
該遺伝子の発現によって得られるタンパク質に対する該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含む化合物の評価方法。
- [10] サルORL1遺伝子を導入し、該遺伝子を発現する細胞を調製する工程と、
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、
該細胞と被検化合物との接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、
該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含む化合物の評価方法。
- [11] 被検化合物を、ORL1としての活性を有するサル由来のタンパク質に接触させる工程と、
該タンパク質と被検化合物との接触による該タンパク質の活性の変化を検出する工程と、を含む化合物の評価方法。
- [12] 前記サルがアカゲザルである、請求項9〜11のいずれか一項に記載の化合物の

評価方法。

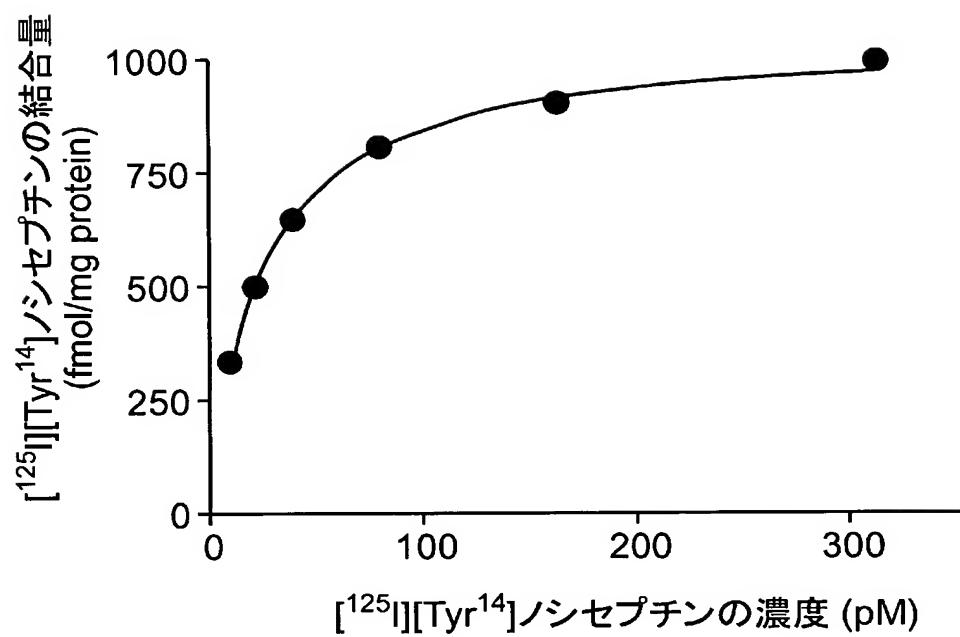
[X]1

rhesus monkey homo sapiens	1	MEPLFPAPFW	EVYGGSHLQG	NSLLSPNHS	LLPPHLLNA	SHSAFLPLGL	50
	1	MEPLFPAPFW	EVYGGSHLQG	NSLLSPNHS	LLPPHLLNA	SHSAFLPLGL	50
rhesus monkey homo sapiens	51	KVTIVGLYLA	VCVGGLLGNC	LVMYVILRHT	KMKTATNIYI	FNALADTLV	100
	51	KVTIVGLYLA	VCVGGLLGNC	LVMYVILRHT	KMKTATNIYI	FNALADTLV	100
rhesus monkey homo sapiens	101	LLTLPFGQTD	ILLGFWPFGN	ALCKTVIAID	YNNMFTSTFT	LTAMSVDRYV	150
	101	LLTLPFGQTD	ILLGFWPFGN	ALCKTVIAID	YNNMFTSTFT	LTAMSVDRYV	150
rhesus monkey homo sapiens	151	AICHPIRALD	VRTSSKAQAV	NVAIWALASV	VGVPVAINGS	AQVEDEEIEC	200
	151	AICHPIRALD	VRTSSKAQAV	NVAIWALASV	VGVPVAINGS	AQVEDEEIEC	200
rhesus monkey homo sapiens	201	LVEIPAPODY	WGPVFAICIF	LFSFIVPVL	ISVCYSLMIR	RLRGVRLLSG	250
	201	LVEIPAPODY	WGPVFAICIF	LFSFIVPVL	ISVCYSLMIR	RLRGVRLLSG	250
rhesus monkey homo sapiens	251	SREKDRNLRR	ITRLVLVVVA	VFVGWTPVQ	VFVLQGLGV	QPQSETAVAI	300
	251	SREKDRNLRR	ITRLVLVVVA	VFVGWTPVQ	VFVLQGLGV	QPQSETAVAI	300
rhesus monkey homo sapiens	301	LRFTALGYV	NSCLNPILYA	FLDENFKACF	RKFCACASALR	RYQVQVSDRVR	350
	301	LRFTALGYV	NSCLNPILYA	FLDENFKACF	RKFCACASALR	RYQVQVSDRVR	350
rhesus monkey homo sapiens	351	SIKDVVALAC	KTSETVPRPA	*	400
	351	SIKDVVALAC	KTSETVPRPA	*	400

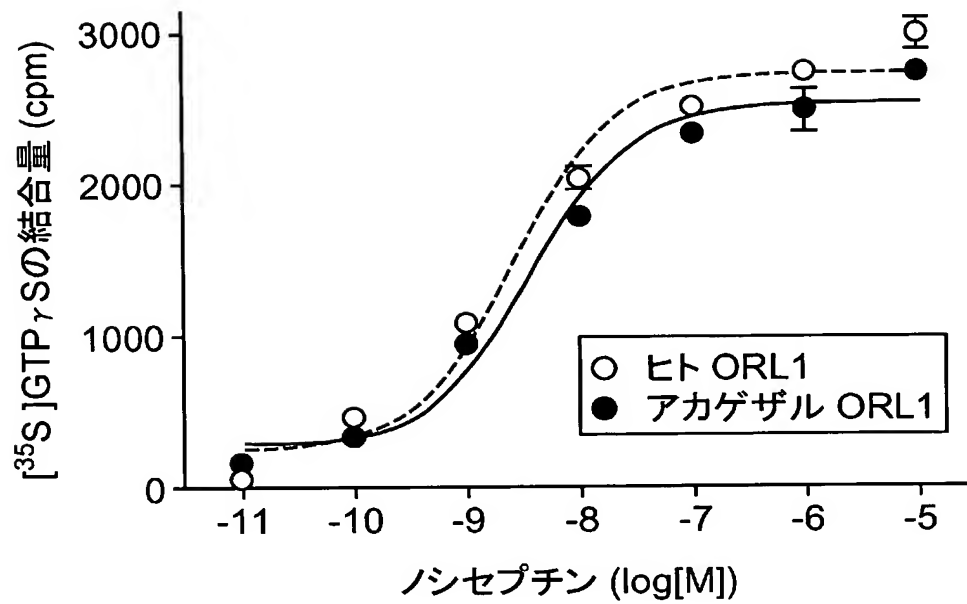
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/10, C12Q1/02, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/10, C12Q1/02, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/
EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLLEREAU, C. et al., "ORL1, a novel member of the pioid receptor family", FEBS Letters, (1994), Vol.341, pages 33 to 38, full text	8
Y		1-12
Y	MOLLEREAU, C. et al., "Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor", NATURE, (1995), Vol.377, pages 532 to 535, full text	1-12
X	BUNZOW, J.R. et al., "Molecular cloning and tissue distribution of the rat opioid receptor gene family that is not a myu, delata, or kappa opiod receptor type", FEBS Letters, (1994), Vol.347, pages 284 to 288, full text	8
Y		1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 January, 2005 (05.01.05)

Date of mailing of the international search report
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016552

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THOMIS, D.C. et al., "Orphanin FQ: A Neuropeptide That Activates an Opioidlike G Protein-Coupled Receptor", SCIENCE, (1995), Vol.270, pages 792 to 794, full text	1-12
X Y	OSINSKI, M.A. et al., "Cloning expression and functional role of a nociceptin/Orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract Eur.J.Pharmacol., (1999), Vol.365, pages 281 to 289, full text	8 1-12
X Y	WO 94/28132 A (ARCH DEVELOPMENT CORP.), 08 December, 1994 (08.12.94), Examples; Seq.ID No: 5, 6 & JP 09-501307 A & EP 0700438 A & US 6096513 A	8 1-12
X	KO, M.C.H. et al., "Orphanin FQ inhibits capsaicin-induced thermal nociception in monkeys by activation of peripheral ORL1 receptors", British J. Pharmacol., (2002), vol.135, pages 943 to 950, full text	11,12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N 15/12, C07K 14/705, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12Q 1/02, C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N 15/12, C07K 14/705, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12Q 1/02, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPIDS (STN)

SwissProt/PIR/GeneSeq

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	MOLLEREAU, C. et al, "ORL1, a novel member of the opioid receptor family"	8
-----		-----
Y	FEBS Letters, (1994), Vol.341, pp.33-38, 全文	1-12
Y	MOLLEREAU, C. et al, "Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor" NATURE, (1995), Vol.377, pp.532-535, 全文	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 01. 2005

国際調査報告の発送日

25. 1. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4 B

3 3 3 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X -----	BUNZOW,J.R. et al, "Molecular cloning and tissue distribution of the rat opioid receptor gene family that is not a myu, delta, or kappa opioid receptor type"	8 -----
Y	FEBS Letters, (1994), Vol.347, pp.284-288, 全文	1-12
Y	THOMIS,D.C. et al, "Orphanin FQ: A Neuropeptide That Activates an Opioidlike G Protein-Coupled Receptor"	1-12
	SCIENCE, (1995), Vol.270, pp.792-794, 全文	
X -----	OSINSKI,M.A. et al, "Cloning, expression and functional role of a noiceptin/Orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract"	8 -----
Y	Eur.J.Pharmacol., (1999), Vol.365, pp.281-289, 全文	1-12
X -----	WO 94/28132 A, (ARCH DEVELOPMENT CORP.), 1994.12.08, EXAMPLE, Seq ID No:5,6	8 -----
Y	& JP 09-501307 A, & EP 0700438 A, & US 6096513 A,	1-12
X	KO,M.C.H. et al, "Orphanin FQ inhibits capsaicin-induced thermal nociception in monkeys by activation of peripheral ORL1 receptors"	11,12
	British J. Pharmacol.,(2002), Vol.135, pp.943-950, 全文	